

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HUDSON GOUVEIA AMSTALDEN

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DE INVASIVIDADE DE
GLIOMAS HUMANOS POR RT-qPCR

CURITIBA

2014

HUDSON GOUVEIA AMSTALDEN

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DE INVASIVIDADE DE
GLIOMAS HUMANOS POR RT-qPCR

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas (Especialização), Departamento de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer

CURITIBA

2014

RESUMO

O processo invasivo é uma característica importante de diversas neoplasias malignas, relacionado diretamente com o prognóstico dos pacientes. O estabelecimento da invasão celular inclui a capacidade das células em remodelar o espaço extracelular. Os gliomas possuem essa característica, e devido à complexidade anatômica desse tecido, a média de sobrevida para pacientes com o grau mais agressivo desse tipo de tumor (grau IV) é de 12 – 15 meses. A invasividade, em geral, é facilitada pela ação das metaloproteases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular (MEC), favorecendo a invasão. As MMPs desempenham papéis em processos fisiológicos, tais como o remodelamento tissular, cicatrização, angiogênese, entre outros. Níveis aumentados destas enzimas podem ser detectados em vários tipos de câncer. Várias proteínas regulam as MMPs, entre elas, seus inibidores teciduais (TIMPs). O equilíbrio proteolítico entre as MMPs e TIMPs é fundamental para o desenvolvimento da agressividade e invasividade dos tumores. Neste trabalho, foi padronizado um protocolo para avaliação da invasividade de gliomas pela técnica de qRT-PCR, levando em consideração o equilíbrio proteolítico pela relação de expressão TIMP/MMP. Usando células de linhagens de gliomas humano (U87MG e U373MG); protocolo foi testado e as relações foram plotadas em gráficos. Nossos resultados indicaram que quanto maior a relação das razões inibidores/metaloproteases, possivelmente menor o potencial de agressividade/invasividade das células. Sendo assim, o parâmetro e a metodologia de análise demonstrados neste trabalho poderiam ser aplicados na rotina laboratorial de acompanhamento de tratamento dos pacientes com gliomas.

Palavras-chave: MMPs, TIMPs, Gliomas, qRT-PCR.

ABSTRACT

The invasive process is an important feature of several malignant cancers, related directly to the patients' prognosis. The establishment of cell invasion include the ability of cells to remodel the extracellular space. Gliomas have this characteristic and because of the anatomical complexity of this tissue, the median survival for patients with more aggressive degree of this type of tumor(gradeIV) is 12- 15 months. The invasivity, in general, is facilitated by the action of matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the extracellular matrix, favoring the invasion. MMPs play roles in physiological processes such as tissue remodeling, cicatrization, angiogenesis, among others. Increased levels of these enzymes can be detected in several types of cancer. Several proteins regulate MMPs, including, their tissue inhibitors (TIMPs).The proteolytic balance between MMPs and TIMPs is critical to the development of aggressiveness and invasiveness of tumors. In this work has been standardized a protocol to evaluate the invasiveness of gliomas by qRT-PCR technique, taking into account the proteolytic balance by the ratio of gene expression TIMP / MMP. Using cell lines of human gliomas (U373MG and U87MG) the protocol has been tested and the ratios were plotted on graphs. The results indicated that the higher is the ratio of inhibitors / metalloprotease, the lower is the degree of invasiveness. Thus, the parameter and the analysis methodology demonstrated in this work could be applied in the laboratorial routine of monitoring of the treatment of patients with gliomas.

Keywords: MMPs, TIMPs, Gliomas, qRT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE METALOPROTEASES DE MATRIZ.....	9
FIGURA 2 – EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEASES (MMPs) E SEUS INIBIDORES (TIMPs) EM LINHAGENS U373MG E U87MG.....	16
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES (TIMP-1)/MMPs DAS LINHAGENS U373MG E U87MG.....	17
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES (TIMP-2)/MMPs DAS LINHAGENS U373MG E U87MG.....	18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO PARA SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR.....	14
TABELA 2 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS – “*American Cancer Society*”

cDNA – DNA complementar (à um mRNA)

DNA – Ácido desoxiribonucléico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GBM – Glioblastoma multiforme

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

HPRT – Hipoxantina Fosforibosil Transferase

INCA – Instituto Nacional do Cancer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteases

mRNA – RNA mensageiro

MT-MMP – Metaloprotease de membrana

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RECK – “*Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs*”

RNA – Ácido Ribonucléico

RT- qPCR – PCR em Tempo-Real

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SPI – Domínio com atividade inibidora de serino proteases

TIMPs – Inibidores teciduais de Metaloproteases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 SOLUÇÕES, MEIO DE CULTURA E LINHAGENS CELULARES	11
2.1.1 Solução salina fosfato tamponada A (PBSA)	11
2.1.2 Solução de tripsina-EDTA	11
2.1.3 Meio de cultura	11
2.1.4 Linhagens celulares	12
2.1.5 Condições de cultivo	12
2.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>TIMPs</i> E <i>MMPs</i>	12
2.2.1 Análise dos níveis de mRNA	12
2.2.1.1 Extração e purificação do RNA celular	12
2.2.1.2 Síntese de cDNA	13
2.2.1.3 Avaliação da modulação da expressão gênica	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas são neoplasias do sistema nervoso central. Dentre eles o glioblastoma (GBM) é um dos mais frequentes e mais devastadores. Cirurgia seguida de radioterapia com quimioterapia adjuvante com temozolomida é o padrão de tratamento em pacientes com GBM, no entanto o prognóstico continua ruim, com uma média de sobrevida de 12 – 15 meses (MINNITI et al., 2009). Anormalidades genéticas do glioblastoma estão associadas com a ativação patológica ou supressão de vias de transdução de sinais intracelulares (OHGAKI, 2009; KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010).

Os tumores da glia, genericamente conhecidos como gliomas, são um grupo de neoplasias que se originam nas células da glia. Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em glioblastomas (também conhecido como glioblastoma multiforme - GBM), astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. De 10 tumores cerebrais, 4 são gliomas. Considerando somente tumores cerebrais malignos, de cada 10, 7 a 8 são gliomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; MINNITI et al., 2009; OHGAKI, 2009). Estimativas para o ano de 2009 feitas pela ACS (American Cancer Society) revelam que cerca de 22.070 novos casos de tumores malignos cerebrais e de medula espinhal foram diagnosticados, destes 12.010 em homens e 10.060 em mulheres. Esses números seriam maiores se os tumores benignos estivessem inclusos na estimativa. Ainda em 2009 cerca de 12.920 pessoas (7.330 – homens; 5.590 – mulheres) foram a óbito em decorrência de tumores malignos de cérebro e medula espinhal. Para o Brasil, estimativas do INCA (Instituto Nacional do Cancer), e com base na estimativa da população brasileira do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) para 2014, revelam que 4.867 novos casos serão diagnosticados em homens e 4.304 em mulheres. Globalmente, a chance de que uma pessoa venha a desenvolver uma neoplasia maligna de cérebro e medula espinhal em seu curso vital é inferior a 1% (cerca de 1 em 150 para homens e 1 em 185 para mulheres). As taxas de sobrevida podem variar muito, dependendo do tipo de tumor, que serão mostrados a seguir.

Os tumores também são classificados de acordo com seu grau de malignidade em uma escala de I a IV (LOUIS et al., 2007). Tumores de grau I são biologicamente benignos e podem ser curados cirurgicamente, se for considerado

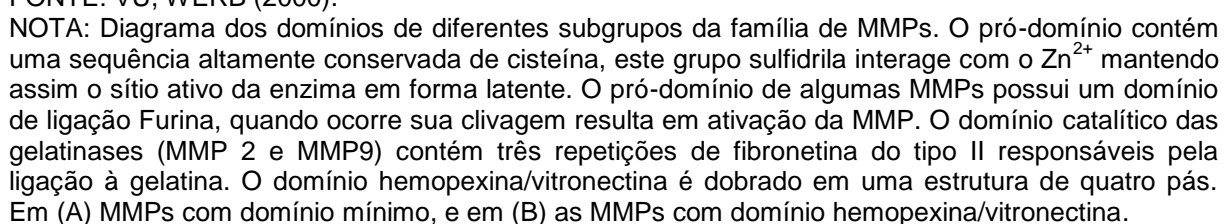
operado no momento do diagnóstico, já os tumores de grau II, são neoplasias de baixo grau que podem se desenvolver por longo curso clínico, mas não são curáveis cirurgicamente, os tumores de grau III são malignos e podem levar a óbito em poucos anos, os tumores de grau IV são altamente malignos e letais dentro de 9-15 meses (MINNITI et al., 2009; STUPP et al., 2005). Uma porcentagem de 70% dos gliomas grau II podem se transformar em grau III e IV dentro de 5-10 anos do diagnóstico inicial, e em seguida, se comportam clinicamente como os tumores de alto grau (MAHER et al. 2001).

Dentre os gliomas, os tumores mais comuns são os astrocitomas, cerca de 3 de 10 tumores cerebrais são astrocitomas. Os astrocitomas de baixo grau (pilócítico – grau I, difuso – grau II) possuem um crescimento lento; de grau intermediário (anaplásico – grau III) crescem em um ritmo moderado a acelerado; de grau elevado (glioblastoma multiforme – grau IV) possuem um rápido crescimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY, 2010).

Uma das características mais importantes de gliomas malignos é sua característica invasiva, o fenótipo agressivo dessas células torna muito desafiador o problema clínico dessa neoplasia. Em pacientes que foram submetidos à cirurgia foi demonstrado que mesmo retirando a massa tumoral podem ocorrer recidivas devido ao desprendimento de algumas células tumorais e invasão do tecido normal adjacente (DEMUTH, BERENS, 2004). Um importante grupo de enzimas, as metaloproteases (MMPs), foram relacionadas ao processo de invasão em quase todos os tipos de tumores, incluindo os gliomas.

As metaloproteases de matriz (MMPs) são uma família multigênica de endopeptidases dependentes de zinco. As MMPs são subdivididas em cinco subgrupos de acordo com seu substrato: a) Colagenases – ativas contra colágenos fibrilares, b) Gelatinases – altamente ativas contra colágenos desnaturados, c) Estromalisinas – degradam componentes não colágenos, d) Matrilisinas – caracterizadas pela ausência do domínio hemopexina e e) Metaloproteases de membrana (MT-MMPs) – que são MMPs transmembranas (MENG et al. 2008; NAGASE et al. 2006; RAFFETTO e KHALIL, 2008). A estrutura e domínios das enzimas MMPs estão representados na figura 1.

Em conjunto, as MMPs podem degradar a maioria dos componentes da MEC e também proteínas conectoras teciduais (VU, WERB, 2000). MMPs são importantes na criação dos microambientes necessários para a embriogênese e



A atividade das MMPs é regulada por três classes de moléculas: (1) α_2 – macroglobulina, glicoproteína presente no plasma, (2) pelos seus respectivos inibidores teciduais, conhecidos como TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), e (3) pela proteína RECK (*Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs*), uma glicoproteína ancorada à membrana. As TIMPs atuam inibindo as MMPs através da interação física, formando complexos TIMP-MMP, porém é interessante citar que TIMP2 possui um papel dual, além de inibir as enzimas MMPs pode atuar também na ativação de MMP 2 (BODE et al., 1999; NAGASE et al., 2006).

Considerando que o equilíbrio entre as MMPs e seus Inibidores Teciduais influencia na progressão e invasividade dos gliomas humanos, o objetivo geral deste trabalho é padronizar um protocolo analítico capaz de quantificar as expressões gênicas e elaborar um perfil de equilíbrio proteolítico para os pacientes com gliomas. Desta forma o protocolo de análise poderia ser incluído como um possível marcador de prognóstico da terapia empregada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SOLUÇÕES, MEIO DE CULTURA E LINHAGENS CELULARES

2.1.1 Solução salina fosfato tamponada A (PBSA)

A solução salina fosfato tamponada (PBSA) foi preparada como uma solução estoque concentrada 5x, sendo que esta solução é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de Na_2HPO_4 e 7,35 mmol/L de KH_2PO_4 . O pH da solução foi ajustado para 7,4, e depois ela foi submetida à esterilização em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

2.1.2 Solução de tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA é constituída de 137 mmol/L de NaCl, 5,4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na_2HPO_4 , 0,44 mmol/L de KH_2PO_4 , 2,3 mmol/L de NaHCO_3 , 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg/% de tripsina, com o pH ajustado para 7,4. O indicador de pH é o vermelho de fenol 15 mg/L. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 μm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C.

2.1.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o DMEM alta glucose (Cultilab), reconstituído em água ultrapura e com pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio é realizado pela adição de NaHCO_3 estéril (autoclavado) e o tamponamento do meio é realizado utilizando HEPES (Sigma Aldrich). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de celulose com poro de 0,22 μm sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB – Cultilab) e 50 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico gentamicina (Neo Química).

2.1.4 Linhagens celulares

As linhagens utilizadas no trabalho foram as seguintes: (1) a linhagem U373MG de glioblastoma astrocitoma humano (2) a linhagem U87MG de glioblastoma astrocitoma (POTÉN; MACYNTIRE, 1969).

2.1.5 Condições de cultivo

In vitro, as células de glioma desenvolveram-se como culturas aderentes cultivadas em garrafas plásticas (poliestireno) estéreis da Techno Plastic Products (TPP). Às garrafas foi adicionado o meio de cultura (DMEM alta glucose) suplementado com 10% de SFB e antibiótico. As células foram mantidas em estufa da marca Sanyo sob atmosfera contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células na garrafa, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as linhagens de gliomas garrafa. Para o armazenamento das linhagens celulares, em geral numa quantidade de 10⁷ células/mL, foram suspensas em meio de cultura suplementado com 10% SFB e 10% de DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido.

2.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TIMPs* E *MMPs*

2.2.1 Análise dos níveis de mRNA

2.2.1.1 Extração e purificação do RNA celular

As células controles foram plaqueadas em uma densidade de 1 x 10⁶ células por placa. As placas utilizadas foram as de 60 mm em meio DMEM alta glucose. As células foram incubadas por 24 horas em estufa nas condições de temperatura e atmosfera mencionadas anteriormente, para que ocorresse a sua adesão nas placas. As células foram desprendidas das placas com a solução de tripsina-EDTA (500 µL por placa), sendo adicionado cerca de 1 mL de meio DMEM alta glucose para manter as células em suspensão. Em seguida, a suspensão de células foi transferida para tubos de centrifuga de 15 mL.

As suspensões de células nos tubos foram submetidas à centrifugação durante 3 minutos a 3.000 g, e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado do tubo para não remover o *pellet* de células. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS, submetidas novamente à centrifugação por 3 minutos a 3000 g, e retirado cuidadosamente o sobrenadante. Os tubos podem ser armazenados a -70°C até a extração do RNA ser realizada.

O RNA celular foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Basicamente, a tecnologia se baseia na propriedade de ligação seletiva do RNA com mais de 200 nucleotídeos à membrana de sílica presente na mini-coluna. Primeiramente as células foram lisadas e homogeneizadas com o tampão RLT (β -mercapetanol / guanidina-tiocianato), além de lisar as células este tampão inativa as RNases presentes na amostra, deixando o RNA intacto. Após a lise, foi adicionado Etanol 70%, necessário para fornecer condições adequadas para a ligação do RNA total à membrana de sílica da coluna. Após várias lavagens com diferentes tampões (RW1 e RPE) sais, metabólitos e outros debris celulares foram removidos, ficando o RNA purificado na coluna, onde o mesmo foi finalmente eluído com água livre de RNases. O RNA puro foi quantificado através da medida de absorbância da amostra em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific) e a integridade do RNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. Esta metodologia de extração prevê um enriquecimento do mRNA, já que a maioria dos RNAs com menos de 200 nucleotídeos (como por exemplo, 5S rRNA, tRNA) são seletivamente excluídos.

2.2.1.2 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar seguiu as especificações da metodologia utilizada – ImProm II *Reverse Transcription System* (Promega), um kit convencional que inclui uma transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para uma síntese de DNA a partir de um mRNA poli (A). Para isso, 1 μ g de RNA total extraído foi transferido para um tubo de 0,5 mL com seu volume final ajustado para 6,5 μ L. Em seguida, 1 μ L de enzima DNase I, 1 μ L de Tampão para a enzima já suplementado com cloreto de magnésio e 0,5 μ L de inibidor de RNase (RNase Out) foram adicionados ao tubo contendo o RNA. Os tubos foram incubados em termociclador (Eppendorf) a 37°C por 10 minutos e depois a 70°C por 5 minutos

para inativação da enzima. Após o tratamento com DNase I, adicionou-se 1 µL de Oligo(dT) para o anelamento com a cauda poli (A) e o tubo foi incubado a 70°C por 5 minutos e rapidamente resfriado em gelo por 5 minutos. Após esta etapa, 10 µL da mistura de reação (TABELA 1) foram adicionados aos tubos, os quais foram incubados a 25°C por 5 minutos.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO PARA SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

Componente	Quantidade
Água livre de RNases	0,5 µL
ImProm II Tampão de Reação 5x	4 µL
Cloreto de Magnésio 5 mmol/L	4 µL
Mix de dNTPs (0,5 mmol/L de cada)	1 µL
RNasin Inibidor de RNase	0,5 µL
ImProm II Transcriptase reversa	1 µL

FONTE: O AUTOR (2014)

Após o tempo de incubação com a mistura de reação, a síntese propriamente dita foi realizada em termociclador (Eppendorf) em 42°C por 60 minutos, e em seguida a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. O cDNA recém-sintetizado foi diluído 1:3 com água livre de RNase e armazenado a -80°C.

2.2.1.3 Avaliação da modulação da expressão gênica

O cDNA sintetizado foi submetido à análise da expressão gênica utilizando a metodologia de PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Os iniciadores específicos para os genes de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP* e também para os genes dos inibidores *TIMP-1* e *TIMP-2* estão apresentados na Tabela 2.

A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (Corbett Reserch) utilizando os reagentes do *Rotor-Gene SYBR Green PCR kit* (Qiagen). A mistura de reação teve um volume final de 18 µL, sendo constituída por: 4,5 µL de cDNA 1:30; 4,5 µL dos iniciadores F (*forward*) e R (*reverse*); e 9 µL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix* (composto pela HotStarTaq Plus DNA polimerase; Tampão da polimerase; mistura de dNTPs; água livre de RNase). Para realização

das reações, as amostras foram incubadas a 95°C durante 5 minutos. Após este tempo, foram realizados cerca de 45 ciclos de amplificação para cada gene testado, sendo que as amostras ficaram 10 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C em cada ciclo. A dissociação foi realizada variando-se a temperatura de 60°C a 90°C. Os valores de CT (*cycle threshold*) dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados por genes de controle interno como *hGAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *hHMBS* (hidroximetilbilano sintase) e *hHPRT* (hipoxantina fosforibosiltransferase). Esta normalização foi realizada pelo software geNorm 3.4 (desenvolvido por VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

TABELA 2 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR

Gene / Concentração	Sequência
MMP-2 (600 nmol/L)	F: 5'-AGCTCCCGGAAAAGATTGATG-3' R: 5'-CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT-3'
MMP-9 (200 nmol/L)	F: 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3' R: 5'-GATTTGACTCTCCACGCATCT-3'
MT1-MMP (600 nmol/L)	F: 5'-GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA-3' R: 5'-TCGAACATTGGCCTTGATCTC-3'
TIMP-1 (600 nmol/L)	F: 5'-CCGCAGCGAGGAGTTTCTC-3' R: 5'-GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA-3'
TIMP-2 (600 nmol/L)	F: 5'-CGACATTTATGGCAACCCTATCA-3' R: 5'-GCCGTGTAGATAAACTCTATATCC-3'
hGAPDH (400 nmol/L)	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
hHMBS (200 nmol/L)	F: 5'-TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT-3' R: 5'-CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC-3'
hHPRT (200 nmol/L)	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

FONTE: O AUTOR (2014)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos do experimento de RT-qPCR estão mostrados na figura 2. Os genes de interesse foram normalizados (usando o *software* geNorm) pela expressão constitutiva de três diferentes genes de controle interno: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*hGAPDH*), gene constitutivamente ativo da via glicolítica; hipoxantina fosforribosiltransferase (*hHPRT*), relacionado com o metabolismo de purinas e; hidroximetilbilano sintase (*hHMBS*), gene envolvido no metabolismo do grupamento HEME.

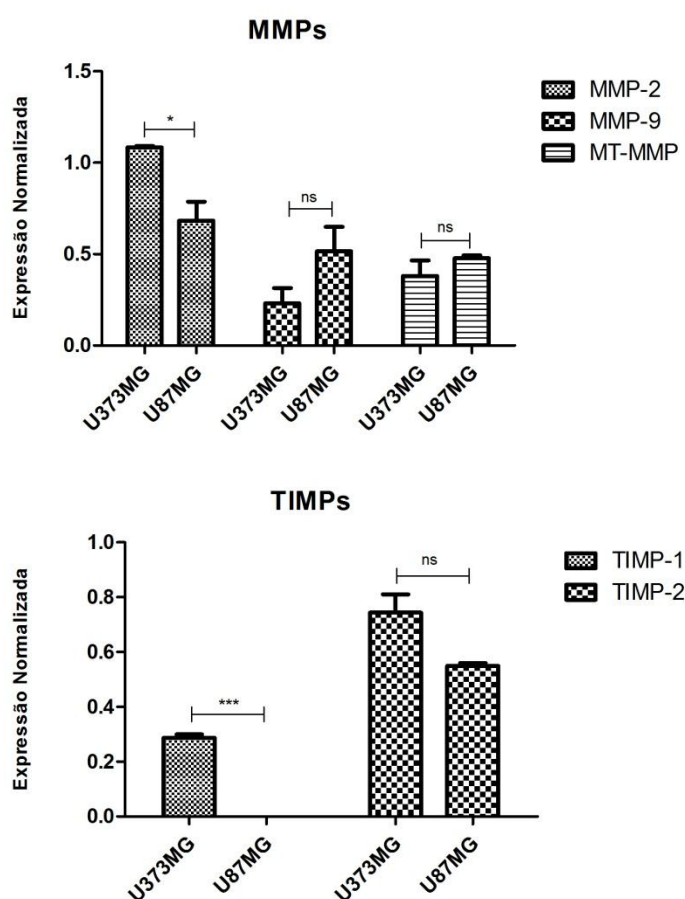


FIGURA 2 – EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEASES (MMPs) E SEUS INIBIDORES (TIMPs) EM LINHAGENS U373MG E U87MG

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Expressão relativa dos genes *MMP 2*, *MMP 9*, *MT1-MMP*, *TIMP 1* e *2* nas células U373MG e U87MG após 48 horas de cultivo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (*hGAPDH*, *hHPRT* e *hHMBS*). Teste t *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Os resultados obtidos indicaram que tanto as células U373MG e U87MG tiveram um perfil de expressão para as MMPs de forma semelhante, exceto para MMP-2 que teve uma maior expressão na linhagem U373MG.

Em relação às TIMPs, a linhagem U373MG teve uma maior expressão de TIMP-1 em relação a U87MG. Portanto, U373MG pode apresentar uma menor invasividade quando comparada com a U87MG.

Uma melhor forma para avaliação de invasividade destes tumores é o equilíbrio entre MMPs e seus inibidores, que pode ser demonstrado pela razão entre o inibidor e a MMP. Se o valor da razão estiver perto, ou for igual a 1, tem-se um equilíbrio entre as quantidades de inibidor e MMP. Quanto maior a razão, maior a quantidade do inibidor em relação à MMP analisada. As representações gráficas das razões das linhagens U373MG e U87MG estão representadas na figura 3 e 4.

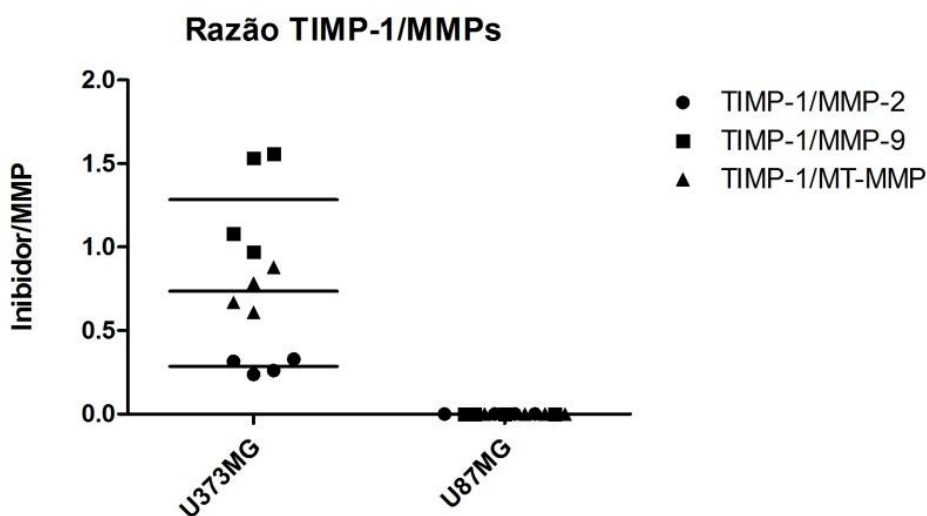


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES (TIMP-1)/MMPs DAS LINHAGENS U373MG E U87MG

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Gráfico das razões do inibidor (TIMP-1)/MMPs (2, 9 e MT1-MMP). Resultados representam a média das razões de quatro experimentos independentes. As razões entre as duas linhagens foram diferentes estatisticamente para as três MMPs (Teste t, $p = 0,0286$).

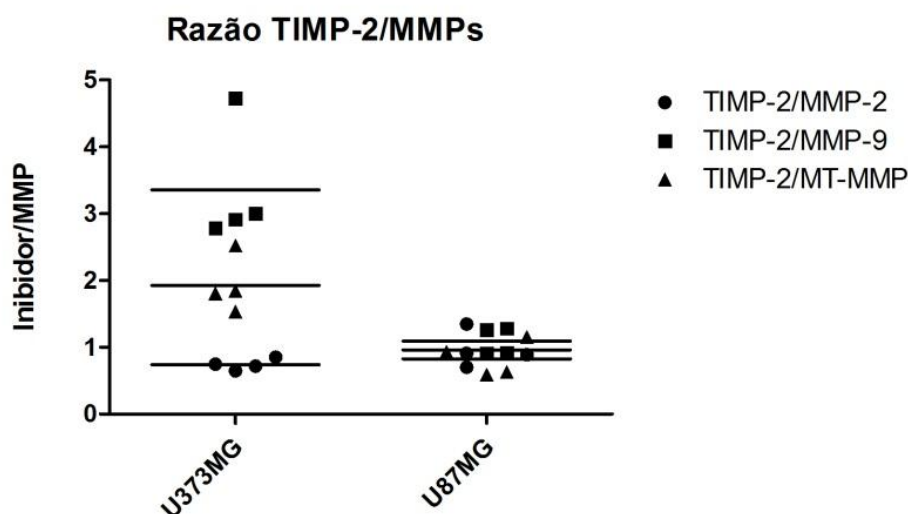


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES (TIMP-2)/MMPs DAS LINHAGENS U373MG E U87MG

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Gráfico das razões do inibidor (TIMP-2)/MMPs (2, 9 e MT1-MMP). Resultados representam a média das razões de quatro experimentos independentes. As razões entre as duas linhagens foram diferentes estatisticamente para as MMPs 9 e MT1-MMP (Teste t, $p = 0,0286$).

Os resultados das razões inibidores/metaloproteases indicaram que quanto maior a relação, menor o grau de invasividade. Sendo assim, o parâmetro e a metodologia de análise demonstrados neste trabalho poderiam ser aplicados na rotina laboratorial de acompanhamento de tratamento dos pacientes com gliomas.

Para avaliação dos dados de expressão relativa dos pacientes, os resultados poderão ser comparados com os obtidos das células de linhagens humanas de gliomas disponíveis nos bancos de células. Desta forma, haverá dados de todos os graus de invasividade, facilitando a conduta clínica.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nessas informações é de fundamental importância à elaboração de testes laboratoriais que possibilite estimar o potencial invasivo deste tumor e também se a terapia está sendo capaz de reduzir a agressividade do glioma. Frente a essa possibilidade, a Análise da Expressão Gênica de MMPs e TIMPs por qRT-PCR, foi validada por este trabalho. Por fim, concluímos que a técnica pode ser empregada em Laboratório Clínico e constitui uma possível ferramenta para auxiliar no prognóstico da terapêutica empregada.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S. M.; LAU, L.; YONG, V. W. MMPs in the central nervous system: Where the good guys go bad. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 19, p.42-51, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

AMSTALDEN, H. G. **Efeitos da Quercetina em Células de Glioma Humano: envolvimento de metaloproteínases de matriz e seus inibidores**. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BODE, W. et al. Insights into MMP–TIMP Interactions. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 878, p.73-91, 1999.

CORREA, T. C. S. et al. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **J Cell Biochem.**, vol. 110, n. 1, p. 52-61, maio 2010.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol.**, vol. 70, p. 217 – 228. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 31 mar. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 31 mar. 2014.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Mol Cancer**, v. 135, n. 9, p.1-14, 1 jun. 2010.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, v. 4, n. 114, p.97-109, 6 jul. 2007.

LUKES, A. et al. Extracellular Matrix Degradation by Metalloproteinases and Central Nervous System Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 19, n. 3, p.267-284, 1999.

MAHER, E. A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & Dev.** vol. 15, p.1311–1333. 2001.

MENG, N. et al. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histol Histopathol**, v. 23, p.1003-1010, 2008.

MINNITI, G. et al. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 12, p.5171-5184, 2009.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, 562-573, 2006.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 274, p. 21491-21494, 1999.

NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY. Disponível em: <<http://www.braintumor.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2010.

OHGAKI, H. Epidemiology of Brain Tumors. In: VERMA, M. (Comp.). **Methods of Molecular Biology: Cancer Epidemiology**. Totowa: Humana Press, 2009. Cap. 14, p. 323-342.

PARK, J. B.; KWAK, H. J.; LEE, S. H. Role of hyaluronan in glioma invasion. **Cell Adhesion & Migration**, v. 2, n. 3, p.202-207, 2008.

POTÉN, J.; MACINTYRE, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 4, n. 74, p.465-486, 1968.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 346-359, 2008.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p.987-996, 10 mar. 2005.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p.1-2, 18 jun. 2001.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, p. 827-839, 2003.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v. 14, p. 2123-2133, 2000.

WINNISCHOFER, S. M. B. **Caracterização do envolvimento do gene RECK na proliferação celular e progressão tumoral**: inversa correlação com a expressão do oncogene c-myc. 152 f. Tese (Doutoramento) - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.